



DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

***Indagine sul ruolo della placenta nello stress ossidativo
del puledro asinino alla nascita***

Candidato: Giulia Percacini

Relatore: Dott.ssa Micaela Sgorbini

Correlatore: Dott.ssa Anna Pasquini

A.A. 2013 – 2014

*“I miei peli, invece, diventavano grossi come setole, e la pelle diventava dura come il cuoio,
ed in cima alle mani le dita non erano più separate ma si univano in un unico zoccolo, e
dall’estremità della spina dorsale mi viene fuori una gran coda.
La mia faccia è enorme, la bocca tutta larga, le narici dilatate, le labbra mi pendono giù:
e mi crescono smisurate orripilanti orecchie pelose.”*

(Lucio Apuleio, *L'asino d'oro*)

“Orientis partibus adventavit asinus, pulcher et fortissimus, sarcinis aptissimus.”

(Anonimo XIII Sec.)

Agli Amici

INDICE

RIASSUNTO.....	3
----------------	---

PARTE GENERALE

Capitolo 1 – Introduzione.....	5
§1.1 Sistema ossidante.....	7
§1.2 Sistema antiossidante.....	11
Capitolo 2 – Ruolo delle specie reattive dell'ossigeno in riproduzione.....	13
§ 2.1 Stress ossidativo in gravidanza ed al parto in medicina umana.....	15
§ 2.2 Stress ossidativo in gravidanza ed al parto in medicina veterinaria.....	23

PARTE SPERIMENTALE

Capitolo 3 – Scopo della tesi.....	27
Capitolo 4 – Materiali e metodi	
§ 4.1 Soggetti.....	31
§ 4.1.1 Criteri di inclusione.....	31
§ 4.2 Monitoraggio e gestione del parto.....	29
§ 4.3 Raccolta e preparazione dei campioni.....	31
§ 4.4 Analisi biochimiche.....	31
§ 4.5 Analisi statistiche.....	33
Capitolo 5 – Risultati.....	34
Capitolo 6 – Discussione e conclusioni.....	35

BIBLIOGRAFIA.....	39
-------------------	----

RIASSUNTO

Parole chiave: asino, BAP, d-ROMs

Scopo. Valutare i radicali idrossilici (d-ROMs) e il potenziale biologico antiossidante (BAP) in fattrici e puledri di Asino sorcino crociato dell'Amiata al fine di verificare lo stato ossidativo perinatale.

Materiali e metodi. Nel presente studio sono state incluse 16 fattrici di asino Sorcino crociato dell'Amiata e rispettivi puledri. Campioni di sangue sono stati raccolti da fattrice, puledro e una delle 2 arterie ombelicali al momento del parto. I campioni sono stati utilizzati per dosare il lattato, d-ROMs e BAP. I risultati sono stati espressi in media e deviazione standard. I dati sono stati analizzati con il test di Kolmogorov-Smirnov per verificare la distribuzione. Poichè essi non presentavano una distribuzione gaussiana, sono stati applicati il Mann Whitney test ed il Dunn's test come *post hoc* per verificare differenze tra fattrice, cordone e puledro, sia per d-ROMs che per BAP. E' stato inoltre eseguito lo Spearman test per verificare la correlazione tra lattato e d-ROMs, e tra d-ROMs e BAP, sia per le fattrici che per i puledri.

Risultati. I d-ROMs sono risultati $257 \pm 41,2$ U.CARR. nella fattrice, $160,3 \pm 27,2$ U.CARR. nel cordone e $198 \pm 67,8$ U.CARR. nel puledro. I BAP sono risultati $2525,3 \pm 632,3$ $\mu\text{mol/l}$, $2414,2 \pm 624,7$ $\mu\text{mol/l}$, $2340,1 \pm 494,2$ $\mu\text{mol/l}$ rispettivamente nella fattrice, nel cordone e nel puledro. È stata osservata una differenza statisticamente significativa tra fattrice vs puledro e fattrice vs cordone ($p < 0,0001$) per i d-ROMs, e tra puledro vs cordone vs fattrice per il BAP. Esiste una correlazione positiva tra concentrazione di lattato ($5,5 \pm 0,8$ mmol/L) e d-ROMs nel puledro ($r = 0,617$; $p < 0,01$).

Discussione e conclusioni. Lo studio indaga il profilo ossidativo/antiossidante in fattrice e puledro asinino determinando la concentrazione dei d-ROMs e del BAP. I valori dei d-ROMs e del BAP ottenuti nella specie asinina sono si sono rivelati più elevati rispetto al cavallo. I nostri risultati hanno riportato una correlazione positiva tra lattatemia e d-ROMs nei puledri, similmente a quanto avviene in altre specie.

ABSTRACT

Key words: BAP, d-ROMs, donkey

Aim. To evaluate hydroxyl radical (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) in donkey mares and their foals in order to study perinatal oxidative status.

Material and methods. A total of 16 donkey mares and their foals were included in the present study. Maternal and foal venous blood samples were collected immediately after delivery along with a sample drawn from one of the umbilical arteries. All plasma samples were evaluated for lactatemia, d-ROMs and BAP. Data distribution, analysed by Komolgorov-Smirnov test, was not Gaussian, thus the Mann Whitney test and Dunn's test as *post hoc* were applied to verify differences between mares vs umbilical cord vs foals, both for d-ROMs and BAP. Pearson test was performed between d-ROMs and BAP, and between d-ROMs and lactatemia, both for mares and foals. Significant results were set with $p < 0.05$.

Results. d-ROMs were $257 \pm 41,2$ U.CARR. in the donkey mare, $160,3 \pm 27,2$ U.CARR. in the umbilical cord, and $198 \pm 67,8$ U.CARR. in the foal. BAP were $2525,3 \pm 632,3$ $\mu\text{mol/l}$, $2414,2 \pm 624,7$ $\mu\text{mol/l}$, $2340,1 \pm 494,2$ $\mu\text{mol/l}$ in mares, umbilical cord and foals, respectively. Statistical analysis showed differences between mares vs umbilical cord and mares vs their own foals for d-ROMs, and between mares vs umbilical cords vs their own foal for BAP. Pearson test showed a positive correlation between d-ROMs and lactatemia in foals.

Discussion and conclusions. This work investigates antioxidative/oxidative profile of donkey mares and their own foals measuring the d-ROMs and BAP concentrations. D-ROMs and BAP values obtained in donkey species resulted higher than in the horse. Our results reported a positive correlation between lactatemia and d-ROMs in foals, similarly to what happens in other species.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo è una condizione patologica che si instaura nell'organismo quando viene meno il fisiologico equilibrio tra sistema ossidante ed antiossidante. Una delle prime definizioni lo descrive come: “*A disturbance in the pro-oxidant – antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage*”, ovvero un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro-ossidanti ed anti-ossidanti in favore dei primi, che può determinare un potenziale danno (Sies, 1985). Tale squilibrio è stato osservato in molte condizioni tra cui il parto, sia in umana che in alcune specie di interesse veterinario.

Il parto rappresenta un momento di elevata criticità, sia per la madre che per il nascituro. La madre si trova a compiere uno sforzo fisico intenso al termine della gravidanza, che comporta, soprattutto nelle ultime fasi, un difficoltoso mantenimento dell'omeostasi, con alterazioni anche rilevanti a carico di diversi apparati (in particolare cardiocircolatorio, respiratorio e digerente) ed un generale innalzamento del metabolismo cellulare che già di per sé comporta stress ossidativo (Miller *et al.*, 1993; Argüelles *et al.*, 2006). Il neonato affronta un subitaneo passaggio dall'ambiente uterino, tendenzialmente ipossico, a quello esterno, che è caratterizzato da un tenore in ossigeno notevolmente più elevato (Muller, 1987). L'aumentata disponibilità di ossigeno, in determinate condizioni può agevolare la produzione di radicali liberi, ed il loro incremento tende a tradursi in danno ossidativo perché il sistema antiossidante alla nascita è ancora insufficiente, soprattutto in soggetti prematuri (Davis e Auten, 2010). L'azione dei ROS sulle molecole bersaglio determina una alterazione dei costituenti cellulari tale da pregiudicare funzionalità ed integrità delle cellule in vari tessuti, e rientra nella patogenesi di numerose patologie neonatali (Mutlu *et al.*, 2011).

A fronte della inefficienza dell'organismo del neonato nel ripristinare l'equilibrio

ossidativo/antiossidativo nel primo post-partum, la placenta sembra invece svolgere un ruolo protettivo nei confronti del feto contro lo stress ossidativo durante la gravidanza ed al momento del parto. In particolare, è stata osservata una concentrazione significativamente più elevata di alcuni indicatori dello stress ossidativo a livello della parte materna della placenta, rispetto a quella fetale. Inoltre è stata dimostrata la permeabilità di questa struttura ad alcune molecole antiossidanti non enzimatiche, che nell'ultimo terzo della gestazione passano al feto, entrando a far parte del suo sistema antiossidante (Qanungo *et al.*, 1998; Lista *et al.*, 2010).

Nella specie equina, il puledro risulta particolarmente predisposto a sviluppare stress ossidativo, sia per il tipo di placenta, che in caso di parto languido o distocico comporta l'instaurarsi di una condizione di grave ipossia, che per il repentino adattamento alla vita extra-uterina (Stoneham, 2011). Il danno indotto dai radicali liberi rientra presumibilmente nell'eziopatogenesi o nelle conseguenze delle più comuni patologie neonatali, come la sindrome da maladattamento o da asfissia perinatale, in particolare nel puledro prematuro o dismaturo, analogamente a quanto è osservato in umana (Saugstad, 2003; Dick e Ford, 2009; Mondal *et al.*, 2010). In quest'ottica il monitoraggio dello status ossidativo del neonato al momento parto può avere interessanti applicazioni, come l'impiego nella diagnosi precoce di stati patologici correlati a danno indotto da ROS, finalizzata ad un tempestivo trattamento, atto a prevenire alterazioni irreversibili in un sistema che si sta adattando alla vita uterina e pertanto è già in precario equilibrio; tuttavia, per individuare una condizione patologica, si deve necessariamente partire dai valori fisiologici determinati in soggetti sani.

In medicina umana questi dati sono facilmente reperibili nell'imponente letteratura sull'argomento, dal momento che la ricerca nel settore dei radicali liberi e delle terapie antiossidanti è a tutt'oggi molto attiva nel campo della neonatologia, ed è notevole il numero di studi sull'equilibrio ossidativo/antiossidativo di madre e neonato in condizioni fisiologiche e patologiche (Agarwal *et al.*, 2005) durante la gravidanza ed al momento parto. Nel cavallo, invece, le conoscenze sono ancora scarse in quanto i lavori relativi a radicali liberi e sostanze antiossidanti vertono per

lo più sul ruolo dello stress ossidativo in esercizio ed affezioni del tratto respiratorio (Soffler, 2007), mentre si contano poche indagini per quanto riguarda la riproduzione; esiste ad oggi un unico riferimento relativo al normale equilibrio ossidativo/antiossidativo nel sistema costituito da fattrice, placenta e puledro (Sgorbini *et al.*, dati personali).

A conoscenza degli autori, non esistono studi pubblicati sulla specie asinina sul sistema ossidante, antiossidante o stress ossidativo, ad eccezione di due lavori recenti. Lo studio recentemente pubblicato da D'Alessandro e collaboratori (2014) valuta l'effetto del verbacoside, polifenolo dotato di proprietà antiossidanti ed infiammatorie (Korkina *et al.*, 2007), sui parametri ossidativi in fattrice asinina e puledro in allattamento, mentre l'indagine di autori iraniani (Kojouri e Sharifi, 2012) valuta l'azione di nanoparticelle di selenio (Se Nps) somministrate per os su alcuni parametri biochimici in asine sottoposte ad esercizio intenso.

Preso atto del rinnovato interesse nei confronti dell'allevamento asinino e del recupero di razze nazionali autoctone a rischio di estinzione come quella dell'asino Sorcino Crociato dell'Amiata (FAO, 1990), si è avvertita l'esigenza di ampliare la conoscenza della fisiologia riproduttiva in questa specie, con particolare riferimento allo stato ossidativo al momento del parto nei soggetti implicati.. Inoltre l'aumentata richiesta di soggetti per la produzione di latti ipoallergenici alternativi a quello bovino, ed attività come l'onoterapia ed il trekking someggiato, a cui l'asino Amiatino sembra essere particolarmente adatto in quanto rustico, robusto e facilmente adattabile, giustifica senz'altro la ricerca in questa razza.

Alla luce delle precedenti considerazioni, il presente lavoro si prefigge di valutare lo stato ossidativo perinatale del puledro asinino, risultante dall'interazione tra sistema ossidante ed antiossidante, e di metterlo a confronto con quello di fattrice e placenta.

§ 1.1 Sistema ossidante

Comprende tutte le specie reattive dell'ossigeno originate nei normali processi metabolici di tipo ossidativo che rappresentano la principale fonte energetica degli

organismi aerobi. L'ossigeno molecolare coinvolto in questi processi va incontro ad una serie di reazioni, fino ad essere ridotto ad acqua, nel corso delle quali dà luogo alla formazione di una serie di intermedi radicalici. Questi sono composti ad alto contenuto energetico estremamente instabili e reattivi, che tendono ad ossidare altre molecole sottraendo un elettrone. Sono generalmente indicati con il termine di “agenti ossidanti” o con l'acronimo di “ROS” (*Reactive Oxygen Species*), e vengono definiti come “molecole contenenti ossigeno più reattivo di quello atmosferico” (Noguchi e Niki, 1999).

I ROS vengono distinti in radicali liberi ed altre specie chimiche altamente reattive.

I radicali liberi di maggiore interesse clinico sono:

- monossido di azoto (NO);
- radicale superossido (O_2^-);
- radicale idrossile (HO).

Composti come il perossinitrito ($ONOO^-$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'acido ipocloroso (HOCl), rientrano nella classe degli ossidanti non radicalici.

In base all'origine, gli agenti ossidanti vengono inoltre classificati in “esogeni” o “endogeni”.

Esistono diverse sostanze ossidanti esogene, come ozono e particelle ultrafini, che possono portare a danni ossidativi soprattutto a livello polmonare, nonostante le difese antiossidanti del tratto respiratorio siano particolarmente sviluppate (Mudway e Kelly, 2000). Agenti ossidanti possono essere introdotti nell'organismo anche con la dieta ed i trattamenti farmacologici.

Le specie reattive dell'ossigeno più rappresentate nell'organismo sono quelle endogene che derivano in massima parte da processi fisiologici. Nello specifico, una buona quota dello stress ossidativo di origine endogena nasce a livello intracellulare dalla riduzione incompleta dell'ossigeno molecolare che si verifica durante il passaggio attraverso la catena di trasporto respiratoria nella membrana mitocondriale interna; l'ossigeno ridotto può dar luogo in minime quantità alla formazione del superossido. La quota di questo radicale prodotta normalmente è trascurabile, ma in

condizioni di innalzamento del livello metabolico può andare ad incidere sull'equilibrio ossidativo/antiossidante. Questo fenomeno si osserva ad esempio nel cavallo sottoposto ad esercizio: al drastico aumento del consumo di ossigeno in risposta alle richieste metaboliche, consegue un marcato incremento di anione superossido (Art e Lekeux, 1993).

Gli altri ossidanti endogeni vengono sintetizzati da enzimi come lipossigenasi, xantina ossidasi, superossido dismutasi (SOD), mieloperossidasi (MPO), ossido nitrico sintasi (NOS), oppure vengono prodotti dai fagociti del sistema immunitario nel corso di processi infiammatori. Gli agenti ossidanti giocano un ruolo importante nell'inattivazione e nella distruzione di microrganismi attraverso la perossidazione e la destabilizzazione delle loro membrane lipidiche, l'ossidazione e l'inattivazione dei loro recettori ed enzimi, e l'ossidazione degli acidi nucleici (Kowaltowski e Vercesi, 1999).

La produzione di ossidanti può essere condizionata dalla presenza di sostanze definite “pro-ossidanti” che ne inducono la conversione in composti più reattivi. Ad esempio il ferro agevola la trasformazione del perossido di idrogeno in radicale idrossilico, mentre la mieloperossidasi porta alla formazione di acido ipocloroso a partire da perossido di idrogeno.

La concezione e la comprensione delle funzioni dei radicali liberi sono cambiate nel tempo, dai primi studi ad oggi. Attualmente i radicali liberi non sono più considerati prettamente negativi, così come gli antiossidanti non sono necessariamente i “buoni” dell'equazione: gli antiossidanti hanno effetti benefici nella misura in cui mantengono gli agenti ossidanti a livelli sufficientemente bassi da svolgere funzioni biologiche utili all'organismo senza provocare danni rilevanti (Halliwell *et al.*, 2006). Le funzioni biologiche per cui è stato dimostrato un ruolo attivo dei ROS sono principalmente la trasduzione di segnale nella cascata dell'infiammazione, nella proliferazione cellulare come nell'apoptosi, in alcuni meccanismi difensivi messi in atto dai leucociti contro organismi patogeni (Valko *et al.*, 2007).

Una mancata modulazione della loro azione comporta la comparsa degli effetti dannosi a carico dei costituenti cellulari. La presenza delle macromolecole danneggiate può ostacolare il normale metabolismo cellulare: l'ossidazione proteica

può tradursi in un malfunzionamento enzimatico, la perossidazione lipidica può compromettere l'integrità di membrana, l'alterazione degli acidi nucleici può portare allo sviluppo di patologie neoplastiche. Tali modificazioni cellulari acquistano particolare rilevanza in condizioni di infiammazione, con l'instaurarsi di un circolo vizioso che porta al progressivo aggravio del danno ossidativo (Valko *et al.*, 2007).

La perossidazione lipidica è un processo mediato da radicali liberi che comporta danni ossidativi a carico delle membrane fosfolipidiche sia della cellula che degli organuli intracellulari. I ROS in presenza di ossigeno reagiscono con i doppi legami dei lipidi di membrana generando perossidi lipidici molto reattivi che propagano il danno ai lipidi vicini, secondo una reazione a catena. Si ritiene che il radicale ossidrilico sia il maggior responsabile di questo fenomeno. Il danno a livello delle membrane cellulari ne altera la permeabilità, compromettendone la funzione ed interferendo sul trasporto di molecole dal compartimento intracellulare all'esterno, e viceversa. Il danno cellulare si esplica in modo diverso a seconda delle cellule coinvolte nel processo ossidativo; ad esempio, se ad essere colpiti sono gli eritrociti, si avrà prima poichilocitosi e successivamente emolisi (Gutteridge, 1995).

I gruppi laterali degli aminoacidi che compongono le catene proteiche sono soggetti all'azione dei radicali liberi. Questi possono promuovere la formazione di legami crociati come ponti disolfuro, che alterano la struttura proteica, oppure possono dar luogo alla formazione di gruppi carbonilici, che infatti vengono impiegati come indici di ossidazione proteica. In conseguenza di tali alterazioni, nella maggior parte dei casi la proteina risulta impossibilitata a svolgere le sue funzioni fisiologiche.

Anche gli acidi nucleici sono soggetti a danni ossidativi. I radicali liberi possono pertanto portare a mutazioni genetiche, inducendo patologie oncologiche, attraverso l'alterazione delle basi azotate e degli zuccheri. Il maggior responsabile di danno a carico degli acidi nucleici è il radicale ossidrilico. Il DNA mitocondriale è maggiormente esposto all'attacco dei radicali liberi rispetto al DNA nucleare, in dipendenza dalla sede (Valko *et al.*, 2006).

Le macromolecole cellulari colpite da ossidazione possono essere individuate ed utilizzate come indicatori di danno ossidativo. Alcuni prodotti della perossidazione lipidica e dell'ossidazione proteica sono ormai abitualmente impiegati nella

valutazione dello stress ossidativo. Sono stati condotti numerosi studi anche sui marker tumorali, con la finalità di impiegarli nella diagnosi precoce delle patologie neoplastiche indotte da radicali liberi.

§ 1.2 Sistema antiossidante

Le cellule hanno sviluppato una serie di meccanismi di difesa dal danno ossidativo che si basano su sistemi enzimatici, definiti “antiossidanti primari”, e su composti non enzimatici a basso peso molecolare, definiti “antiossidanti secondari”.

Un'altra classificazione, in base all'origine, distingue tra antiossidanti endogeni, rappresentati da enzimi sintetizzati nell'organismo ed altre molecole, ed esogeni, ovvero introdotti dall'esterno principalmente con la dieta.

A parte l'acido lipoico, che ha proprietà sia idrofobiche che idrofiliche, la maggior parte degli antiossidanti endogeni può essere ulteriormente suddivisa in due gruppi: antiossidanti idrofobici, che rivestono un ruolo importante nel proteggere i lipidi di membrana dalla perossidazione, ed antiossidanti idrofilici, che esercitano la loro azione nel plasma e nel citoplasma cellulare, proteggendo proteine, carboidrati ed acidi nucleici dall'ossidazione.

Negli antiossidanti idrofobici rientrano:

- α -tocoferolo ovvero vitamina E;
- β -carotene o vitamina A;
- flavonoidi;
- ubiquinolo;
- bilirubina;
- melatonina.

Gli antiossidanti idrofilici comprendono:

- glutatione;
- acido urico;
- acido ascorbico o vitamina C;

- tioli;
- proteoglicani;
- acido ialuronico.

Tutte le sostanze che rientrano nella definizione di antiossidanti sono agenti riducenti, ovvero tendono ad ossidarsi in presenza di accettori di elettroni. Essi contrastano lo stress ossidativo attraverso vari meccanismi, quali la prevenzione della formazione dei ROS, l'inattivazione degli agenti ossidanti, attraverso la conversione in composti progressivamente meno reattivi, e la limitazione ed eventuale riparazione dei danni.

La prevenzione e l'inattivazione dei ROS viene attuata principalmente a livello mitocondriale da enzimi specifici. I più rappresentativi sono:

- superossido dismutasi (SOD);
- catalasi (CAT);
- glutazione perossidasi (GPx).

La superossido dismutasi converte il radicale superossido in perossido di idrogeno, molto meno reattivo; la catalasi agisce sul perossido di idrogeno trasformandolo in acqua ed ossigeno; la glutazione perossidasi converte perossido di idrogeno e glutazione ridotto in glutazione ossidato ed acqua, inoltre trasforma radicale ossidrilico e glutazione ridotto in glutazione ossidato ed acqua.

Selenio, zinco, rame e manganese intervengono anch'essi nella detossificazione dei ROS, in quanto agiscono da coenzimi della glutazione perossidasi (Se) e della superossido dismutasi (Zn, Mn, Cu).

Se gli antiossidanti non sono stati in grado di prevenire l'ossidazione delle macromolecole cellulari, entrano in azione numerosi meccanismi che determinano la distruzione o la riparazione di proteine, lipidi o acidi nucleici danneggiati, limitando di fatto le ripercussioni del danno ossidativo (Winrow *et al.*, 1993; Beckman e Ames, 1998).

Capitolo 2

RUOLO DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO IN RIPRODUZIONE

I ROS sono indispensabili al corretto funzionamento di numerose funzioni dell'apparato riproduttivo, in quanto sono implicati a vari livelli nella regolazione del metabolismo cellulare.

Sono state condotte diverse indagini sul coinvolgimento delle specie reattive dell'azoto (NRS) nella regolazione di alcune funzioni endometriali ed ovariche, nell'eziopatogenesi dell'endometriosi, oltre che nei meccanismi di mantenimento della quiescenza uterina e di inizio del parto (Creasy *et al.*, 1994).

L'azione esplicata dal NO su vascolarizzazione e miometrio è modulata dal sistema antiossidante materno e fetale attraverso l'azione della NO sintetasi e la *down regulation* dei segnali placentari NO-dipendenti. Queste interazioni sono fondamentali per un corretto sviluppo vascolare. Uno studio di Bansal e collaboratori (1997), infatti, ha stabilito una relazione tra calo dell'espressione dei geni codificanti per NOS (Ossido Nitrico Sintetasi) nei miociti del miometrio e fine gravidanza/parto. L'indagine è stata condotta su 5 gruppi di donne: non gravide; pretermine; a termine; pretermine al momento del parto; a termine durante il parto. Gli autori hanno riscontrato la presenza di iNOS (sintasi inducibile dell'ossido nitrico) nelle cellule muscolari lisce del miometrio, in quantità superiore nelle pazienti pretermine, mentre a fine gravidanza è stato osservato un calo sensibile (75%) e al momento parto l'espressione di iNOS è risultata quasi al di sotto dei metodi di analisi adottati, sia nel caso di parto a termine che prematuro.

Con il procedere della ricerca in questo settore, gli agenti ossidanti sono risultati essere implicati in un numero crescente di processi metabolici ed è altrettanto riconosciuta la loro responsabilità nel determinismo di danni ossidativi a vari livelli, qualora la loro concentrazione superi quella sfruttata nei meccanismi cellulari per le normali esigenze dell'organismo (Agarwal *et al.*, 2005).

I radicali liberi intervengono in numerosi processi patologici a carico dell'apparato

riproduttivo, dalla maturazione degli ovociti alla fertilizzazione della cellula uovo, fino allo sviluppo dell'embrione. Lo stress ossidativo è stato spesso associato ad infertilità e si pensa che rientri nel determinismo del calo della funzionalità riproduttiva con l'avanzare dell'età. Inoltre esso è implicato nella patogenesi di patologie neoplastiche come il carcinoma ovarico, in relazione alla stimolazione rappresentata dall'ovulazione ripetuta. Gli agenti antiossidanti, in quest'ottica, hanno un ruolo importante nel prevenire il danno ossidativo a carico del DNA dell'epitelio ovarico (Mutinati *et al.*, 2014).

In umana gli effetti dello stress ossidativo sulla riproduzione sono sempre più documentati, nell'infertilità come in patologie legate alla gravidanza, che si riflettono inevitabilmente sulle condizioni di salute del nascituro. Le condizioni ad oggi più indagate per quanto riguarda la riproduzione in relazione allo stress ossidativo sono la pre-eclampsia, l'aborto e il parto prematuro, il diabete gravidico. Tali condizioni si riflettono necessariamente sullo stato di salute del neonato, che già in condizioni normali è particolarmente predisposto allo stress ossidativo. Il passaggio repentino dall'ambiente uterino all'esterno comporta, infatti, un'improvvisa esposizione del neonato all'ossigeno ambientale, che richiede un subitaneo adattamento sistemico e soprattutto dell'apparato respiratorio (Mutinati *et al.*, 2014). Al primo atto respiratorio dopo la nascita, il neonato viene ad essere esposto ad una concentrazione di ossigeno sensibilmente superiore a quella intrauterina, e questo esita in un incremento dei processi metabolici aerobici. La fisiologica transizione da fetale a neonatale che avviene a livello di apparato respiratorio si basa sulla distensione polmonare indotta dell'inspirazione che, a sua volta, attiva la NOS endoteliale, implicata nella generazione di NO (Ossido Nitrico) (Farrow *et al.*, 2008). Questo porta in ultima istanza a vasodilatazione che permette il graduale adattamento del sistema cardiocircolatorio alla vita extrauterina (Alderton *et al.*, 2001). Oltre ad indurre vasodilatazione, i primi atti respiratori determinano anche un aumento della produzione di ROS (Gaal *et al.*, 2006). Se questo processo produttivo non è adeguatamente contrastato dal sistema antiossidante, si instaura lo stress ossidativo. Numerose patologie neonatali rientrano nella definizione di “*oxygen radical diseases of neonatology*” proposta da Saugstad nel 1988, come la displasia broncopolmonare,

la leucomalacia periventricolare, l'encefalopatia neonatale, la retinopatia del prematuro e l'enterocolite necrotizzante, oltre a disfunzioni renali neonatali (Ricci e Ronco, 2013).

Evidenze di una correlazione tra alterazioni dello stato ossidativo e del sistema ossidante e patologie neonatali sono state rinvenute anche in vitelli, cuccioli, agnelli, puledri e lattonzoli. È stato infatti documentato da vari autori il ruolo di danni ossidativi conseguenti ad ipossia/iperoossigenazione nell'eziopatologia dei più comuni stati patologici che possono insorgere nel *post partum*, quali disfunzioni cardiovascolari e polmonari, acidosi, alterazioni gastroenteriche anatomiche e funzionali, riduzione dell'assorbimento intestinale e mancato trasferimento di immunoglobuline colostrali (Mutinati *et al.*, 2014).

Il fine ultimo della ricerca nel settore è la diagnosi precoce dei disordini riproduttivi legati allo stress ossidativo e l'individuazione di trattamenti antiossidanti efficaci, atti a prevenire o limitare l'entità del danno ossidativo in madre e figlio (Agarwal *et al.*, 2005).

§ 2.1 Stress ossidativo in gravidanza ed al parto in medicina umana

Negli ultimi anni stati svolti numerosi studi per accertare lo stato ossidativo nelle varie fasi della vita riproduttiva della donna ed alcuni hanno indagato specificamente il profilo ossidativo/antiossidante di madre e figlio durante gravidanza e parto (Qanungo *et al.*, 2000; Mutlu *et al.*, 2011; Noh *et al.*, 2014; Buonocore *et al.*, 2002). Nonostante le marcate differenze di metodiche, parametri adottati e modalità di indagine, sono stati raggiunti risultati concordi in vari studi su molte problematiche attinenti a gravidanza, parto e puerperio, tutte correlate a danno ossidativo.

In gravidanza si osserva un aumento della produzione di ROS e RNS (*Reactive Nitrogen Species*), che esita in stress ossidativo. Il parto a termine induce un incremento della lipoperossidazione, testimoniato da un innalzamento nella concentrazione di indicatori ossidativi come la malondialdeide (Mocatta *et al.*, 2004). Anche i livelli di alcuni idroperossidi sono risultati più alti nelle pazienti durante il travaglio, rispetto ai controlli (Fainaru *et al.*, 2002).

Anche nel feto si osservano alterazioni dello stato ossidativo in corrispondenza di fine gravidanza, come un marcato aumento delle riserve antiossidanti rispetto alle fasi precedenti (Agarwal *et al.*, 2005).

In uno studio teso a valutare il ruolo della placenta nel prevenire lo stress ossidativo fetale (Lista *et al.*, 2010), sono stati prelevati campioni ematici da 45 donne sane e dai loro neonati alla nascita. È stata quindi determinata la concentrazione di radicale idrossilico (OH^\bullet) e TAS (*Total Antioxidant Capacity*) presi a riferimento rispettivamente come indicatori dell'attività ossidativa ed antiossidante. Gli autori hanno riscontrato, per quanto riguarda il radicale idrossilico, valori superiori nel sangue materno rispetto al sangue del cordone ombelicale ($573,75 \pm 170 \text{ U.CARR/l}$ vs $40,08 \pm 33,37 \text{ U.CARR/l}$) ($p < 0.01$), mentre i valori di TAS non hanno evidenziato differenze tra i due gruppi ($1,11 \pm 0,09 \text{ mmol/l}$ vs $1,17 \pm 0,12 \text{ mmol/l}$). È stata, inoltre, riportata una differenza statisticamente significativa tra i neonati in base al sesso, in quanto la concentrazione di TAS è risultata notevolmente superiore nelle femmine rispetto ai maschi. Gli autori hanno concluso che il ruolo protettivo della placenta contro lo stress ossidativo fetale consiste nel limitare il passaggio degli agenti ossidanti dalla circolazione materna a quella fetale, consentendo invece il transito, soprattutto nell'ultimo terzo di gravidanza, di composti antiossidanti dalla madre al feto.

L'espressione degli enzimi antiossidanti aumenta nella maggior parte dei compartimenti fetali con l'avanzare della gravidanza, in particolare è stato documentato un incremento dell'attività di superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi e glutatione redutasi parallelamente al riscontro di un calo della lipoperossidazione in tessuti placentari e fetali (Qanungo *et al.*, 2000).

Una precedente indagine su stato antiossidante e lipoperossidazione nell'unità feto-placentare aveva determinato i valori di una serie di indicatori ossidativi ed antiossidanti al momento del parto (Qanungo *et al.*, 1999). In questo studio erano stati esaminati campioni biologici quali: (1) placenti in fase di sviluppo (6-24 settimane) ottenute da aborto e (2) placenti a termine ottenute da donne sane con gravidanza fisiologica in seguito parto naturale o cesareo; (3) sangue proveniente da cordone ombelicale prelevato al momento del parto. L'attività degli enzimi

antiossidanti presi in esame, quali la superossido dismutasi, la glutazione perossidasi e la glutazione reduttasi sono risultati leggermente inferiori nel cordone rispetto alla placenta, avvalorando l'ipotesi di una maggiore azione detossificante nella circolazione fetale rispetto al tessuto placentare, mentre la catalasi è risultata inferiore nel neonato rispetto al cordone. Nella placenta a termine sono stati osservati valori molto bassi di glutazione intracellulare e livelli elevati di glutazione perossidasi e glutazione reduttasi. L'aumentata attività della glutazione perossidasi nella placenta a termine rispetto al cordone ombelicale è risultata in linea con quanto sostenuto da Halliwell *et al.* (1989), ossia che la glutazione perossidasi sia uno dei principali antiossidanti enzimatici presenti nei tessuti.

Sempre nello studio di Qanungo collaboratori (2009) è stato valutato l' α -tocoferolo, come antiossidante non enzimatico, al fine di confermare o meno il suo ipotetico ruolo nel limitare la lipoperossidazione delle membrane cellulari a livello della placenta. Dallo studio è emersa una concentrazione 10 volte superiore a quella osservata nel cordone ombelicale, suggerendo una presenza diffusa di questa molecola lipofila nei tessuti placentari. I valori relativi alla concentrazione di un altro importante agente antiossidante, l'acido ascorbico, sono risultati adeguati nel cordone ombelicale. L'entità della quota di bilirubina riscontrata in placenta a termine e cordone è stata considerata indicativa di una adeguata difesa antiossidante sia materna che fetale. La concentrazione di malondialdeide, indice di lipoperossidazione indotta da ROS, è risultata progressivamente decrescente nella placenta con il procedere della gravidanza ed i valori inferiori sono stati registrati nel cordone al momento del parto. Questo rilievo è stato considerato suggestivo di una correlazione tra livelli inferiori di lipoperossidazione e maggiori di attività antiossidante nell'unità feto-placentare. In sintesi, lo studio di Qanungo e collaboratori (1999) ha confermato che l'unità feto-placentare è efficace nel mantenere nella norma i parametri ossidativi del neonato fino al momento del parto, attraverso l'azione detossificante combinata di una serie di molecole che agiscono su vari processi cellulari in modo specifico.

I lavori più recenti (Mutlu *et al.*, 2011; Noh *et al.*, 2014) si sono concentrati sullo

studio dello stato ossidativo durante il parto naturale in confronto al parto cesareo.

Mutlu e collaboratori, in uno studio del 2011, hanno valutato le variazioni dell'equilibrio ossidativo/antiossidante in relazione al tipo di parto su 66 donne e rispettivi neonati. Le pazienti sono state suddivise in 2 gruppi in base al tipo di parto, quindi sono stati prelevati campioni di sangue da madre, cordone ombelicale e neonato ed è stata valutata la concentrazione di TAC (*Total Antioxidant Capacity*) e TOS (*Total Oxidant Status*). I valori di TOS ottenuti in pazienti sottoposte a taglio cesareo e rispettivi cordoni e figli sono risultati superiori rispetto al gruppo in cui il parto è avvenuto naturalmente, mentre per i valori di TAC è stato osservato l'opposto. Lo studio ha portato ad associare il parto cesareo con uno stress ossidativo più elevato sia nella madre che nel neonato e i meccanismi di difesa sono risultati insufficienti a contenere l'eccesso di ROS.

Noh e collaboratori (2014) hanno comparato i marker di stress ossidativo determinati nel sangue di cordone ombelicale ottenuti durante parto naturale che cesareo. Gli autori riportano livelli di lipoperossidazione nel sangue ombelicale significativamente più elevati in caso di parto cesareo ed anche la capacità antiossidante nel sangue venoso ombelicale si è dimostrata superiore nelle pazienti che hanno partorito in seguito a taglio cesareo. Questo risultato è stato interpretato come una conferma della correlazione tra parto cesareo e maggiore esposizione di madre e figlio a stress ossidativo.

In uno studio del 2006 di Arguelles e collaboratori è stata valutata, su un gruppo di pazienti sane con gravidanza regolare e a termine e sui rispettivi figli subito dopo il parto, la relazione tra stato ossidativo della madre e del neonato alla nascita. I campioni sono stati ottenuti da prelievi di sangue venoso effettuati nella madre durante il *pre partum* e nel cordone prima che il neonato iniziasse a respirare. L'analisi dei campioni ha permesso la determinazione della concentrazione di alcuni indicatori dello stress ossidativo, come lipoperossidi e TAC. I dati hanno evidenziato una correlazione positiva tra stato ossidativo della madre e del neonato, per cui valori di agenti ossidanti più elevati nella madre sono risultati parimenti più alti anche nel figlio. In particolare le donne fumatrici e i loro neonati hanno mostrato livelli più alti

di lipoperossidi e più bassi di TAC. È stata evidenziata inoltre una correlazione positiva tra stress ossidativo nel neonato e riduzione del peso alla nascita, suggerendo la necessità di monitorare lo stato ossidativo della madre durante la gravidanza, nell'ottica di ridurre il rischio di malattie metaboliche per entrambi.

La prematurità rientra tra le patologie neonatali più documentate. Sono stati effettuati numerosi studi sul ruolo dello stress ossidativo nei neonati prematuri. Il parto prematuro spesso si verifica prima che avvenga il fisiologico incremento dell'attività di antiossidanti enzimatici e non, come glutatione e ceruloplasmina. L'aumento dei ROS può presentarsi durante stati di iperossigenazione, riperfusione e/o infiammazione, tipicamente collegati alla prematurità. Il prematuro è particolarmente esposto a danni indotti da ROS in quanto non dispone di una sufficiente quota di agenti antiossidanti alla nascita, dal momento che il loro passaggio da madre a feto attraverso la placenta avviene soprattutto nelle ultime fasi della gravidanza. Inoltre la capacità di aumentare la sintesi degli antiossidanti in risposta all'iperossigenazione è relativamente carente (Lee, 2010).

Buonocore e collaboratori (2002) hanno studiato lo stato ossidativo in neonati prematuri. Nello studio sono stati inclusi 15 bambini prematuri non ipossici e 34 prematuri ipossici. Al momento del parto sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena ombelicale, quindi il campionamento è stato ripetuto a 7 giorni di vita. I campioni sono stati esaminati per determinare i valori di alcuni indicatori dello stress ossidativo, ovvero ipoxantina, idroperossido totale (TH) ed AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*). I livelli plasmatici di ipoxantina, TH ed AOPP misurati in cordone e campioni ematici raccolti al settimo giorno sono risultati significativamente più elevati nei soggetti ipossici rispetto al gruppo di controllo, inoltre è stato riscontrato un significativo innalzamento di AOPP e TH dal momento del parto al settimo giorno *post partum* nei neonati normali, che è stato attribuito al fatto che un certo grado di danno ossidativo è comunque presente nel prematuro, seppure non ipossico.

Georgeson e collaboratori nel 2002 hanno effettuato un confronto tra neonati a termine e prematuri misurando i ROS ed il potenziale antiossidante totale. Sono

risultati valori inferiori per il potenziale antiossidante nei soggetti pretermine, ed è stata dimostrata una correlazione positiva tra parto cesareo ed aumento di ROS in entrambi i gruppi.

In conseguenza dell'inefficienza del sistema antiossidante, il neonato prematuro è maggiormente predisposto a patologie neonatali come displasia broncopolmonare, retinopatia del prematuro, enterocolite necrotizzante e leucomalacia periventricolare (Davis, 2010).

Uno studio recente ha ampiamente dimostrato l'associazione tra elevati livelli di marker dello stress ossidativo nel sangue di cordone ombelicale ed aumentato rischio di contrarre patologie neonatali (FRD, *Free Radical-related Disease*) correlate ai radicali liberi, come retinopatia della prematurità, displasia broncopolmonare, enterocolite necrotizzante, emorragia intraventricolare (Perrone *et al.*, 2010). In particolare, lo studio è stato condotto su 168 neonati prematuri, di età gestazionale compresa tra 24 e 32 settimane. Tutti i bambini sono stati sottoposti a prelievo ematico dal cordone ombelicale alla nascita. I campioni sono stati valutati per tre indicatori di rischio di stress ossidativo quali NPBI (*Non-Protein Bound Iron*), BSA (*Basal Superoxide Anion*), USSA (*Under-Stimulation Superoxide Anion*), e due marker di danno ossidativo: TH (*total hydroperoxides*) ed AOPP (*advanced oxidation protein products*). I risultati dello studio evidenziano una correlazione positiva tra elevati livelli di TH, AOPP e soprattutto di NPBI ed aumentato rischio di FRD. Sulla base dei risultati, gli autori hanno affermato che la valutazione dei marker di stress ossidativo è utile nell'identificazione di neonati prematuri a rischio di FRD.

Abiaka e Machado (2012) hanno studiato lo stress ossidativo al momento del parto in relazione alla durata della gravidanza. Il lavoro è stato effettuato determinando la concentrazione plasmatica di monossido di azoto (NO), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPx) in 37 donne e nei loro neonati. Le analisi sono state effettuate su campioni di sangue venoso prelevato dalla madre durante il parto e dal cordone ombelicale immediatamente dopo il parto. I valori di NO sono risultati più elevati e quelli relativi all'attività della GPx più bassi nelle pazienti con parto prematuro rispetto al gruppo di pazienti che hanno partorito a termine. Similmente nei neonati

prematuri sono stati osservati valori di GPx inferiori rispetto ai soggetti nati a termine.

Lo stato ossidativo di madre e neonato sembra anche avere conseguenze sul peso di quest'ultimo alla nascita. In uno studio (Saker *et al.*, 2008) condotto su 139 donne e sui loro neonati sono stati determinati i valori plasmatici della attività antiossidante totale (ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity), vitamine A, C, E, idroperossidi, e attività enzimatiche antiossidanti eritrocitarie come catalasi, glutazione perossidasi, glutazione reduttasi e superossido dismutasi, e confrontati con il peso alla nascita, classificato come SGA (*Small for Gestational Age*), AGA (*Appropriate for Gestational Age*) e LGA (*Large for Gestational Age*). Livelli significativamente più bassi di ORAC, vitamine C ed E, e più alti di idroperossidi sono stati associati al gruppo degli SGA. Inoltre nei soggetti SGA è stata riscontrata un'alterazione nelle attività degli enzimi antiossidanti eritrocitari.

Anche Osorio e collaboratori (2010) hanno valutato le variazioni di FRP (*Ferric Reducing Potential*), superossido dismutasi, e glutazione ridotto in qualità di indici antiossidanti e malondialdeide sierica in qualità di indice di lipoperossidazione in relazione al peso del bambino alla nascita. In questo studio è stata dimostrata una correlazione positiva tra peso alla nascita e livelli di superossido dismutasi e glutazione ridotto, avvalorando la tesi di un'azione diretta dello stato antiossidante sul peso.

La correlazione tra stress ossidativo e peso alla nascita è stata studiata da Negi e collaboratori nel 2012 in 124 neonati prematuri. Gli autori hanno determinato i livelli di malondialdeide, TAC, vitamina A, E e C a partire da campioni ematici prelevati dal cordone ombelicale. Nei neonati prematuri con peso ridotto alla nascita sono stati osservati un aumento della lipoperossidazione, contestualmente ad un calo delle vitamine e della TAC, ed una correlazione negativa tra MDA e TAC.

In uno studio precedente, la condizione di IUGR (Intra Uterine Growth Retardation) era stata messa in relazione con la concentrazione placentare di metalli e piuttosto che con attività antiossidanti (Llanos e Ronco, 2009). Gli autori hanno misurato la concentrazione di zinco (Zn), selenio (Se), arsenico (As), mercurio (Hg), ferro (Fe), rame (Cu), piombo (Pb) e cadmio (Cd) nelle placente di 20 madri di neonati con

IUGR nati da parto a termine. Oltre che alla concentrazione dei metalli, sono stati anche determinati i livelli di glutazione totale, TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species), TAC ed attività antiossidanti enzimatiche (glutazione perossidasi, superossido dismutasi). Gli autori riportano valori inferiori di Fe, e superiori di Cd, Pb ed As nelle placente delle madri di neonati con peso ridotto alla nascita, ma non sono state riscontrate differenze significative rispetto al gruppo di controllo per quanto concerne i parametri di stress ossidativo o le attività antiossidanti.

Al- Saleh e collaboratori (2014) hanno studiato la relazione tra Hg e stato ossidativo in 250 donne sane, valutandone gli effetti su una serie di rilievi antropometrici effettuati sul neonato alla nascita, e l'eventuale azione protettiva svolta dal selenio contro lo stress ossidativo Hg-indotto. La concentrazione di Hg e selenio (Se) è stata misurata sia nel sangue di cordone ombelicale che nelle placente, analogamente ai livelli di malondialdeide, quale parametro di stress ossidativo. È risultata, tra le altre osservazioni, una correlazione positiva tra la concentrazione placentare di Hg e la riduzione del peso alla nascita. Sulla base dei risultati gli autori hanno concluso che Hg, Se e l'interazione tra i due elementi potrebbero rientrare nei meccanismi condizionanti un fisiologico decorso del peri-parto, sottolineando la necessità di ulteriori indagini volte a valutare l'impatto di alcuni metalli sullo sviluppo fetale.

Metalli come il Fe, particolarmente abbondante nella placenta, giocano un ruolo importante nella generazione dei radicali liberi. I meccanismi protettivi contro il danno ossidativo aumentano nel corso della gravidanza e proteggono il feto che è comunque esposto ad un certo grado di stress ossidativo. Questo aumenta drasticamente a partire dal secondo trimestre di gravidanza, pertanto la seconda metà della gestazione risulta essere un periodo critico per la salute e la sopravvivenza del feto. Esistono molte condizioni patologiche esclusive della gravidanza, come ipertensione e diabete gravidico, correlate a danno indotto da radicali liberi. Non solo gli antiossidanti, ma anche livelli di Fe appropriati sono importanti nella prevenzione del danno ossidativo. E' però necessario non eccedere nella supplementazione in gravidanza di microelementi al fine di non incorrere in patologie correlate al sovradosaggio. In uno studio effettuato su topi supplementati con Fe è stato dimostrato un danno sulla mucosa intestinale dovuto all'azione dell'eccessiva

quantità di Fe somministrato che in parte permaneva nel lume intestinale e esponeva gli enterociti ad un danno ossidativo Fe-indotto (Viteri *et al.*, 1995).

Uno studio condotto sulla supplementazione di Fe a partire da metà gravidanza su donne anemiche e non ha riportato che l'integrazione è utile soltanto per il gruppo "anemia", ma risulta tossica per il gruppo "non anemici". Gli autori correlano patologie riscontrate nelle donne incluse nel gruppo "no anemia" quali eccesso di concentrazione epatica di Fe, ipercromatosi e parto prematuro, e nei rispettivi figli, quali peso ridotto alla nascita (Casanueva e Viteri, 2003).

Lo stress ossidativo è stato messo in relazione patologie della gravidanza, come pre-eclampsia, distacco placentare prematuro, IUGR e morte fetale. Per quantificare la produzione di ROS intrauterina sono stati impiegati diversi indicatori, misurati nel sangue del cordone ombelicale. Esiste infatti una correlazione tra la concentrazione di tali indicatori e lo sviluppo di numerose patologie neonatali (Lee *et al.*, 2010).

Mutlu e collaboratori (2012) hanno studiato l'effetto del numero di gravidanze della madre sull'equilibrio ossidativo/antiossidante del sangue ombelicale. Su campioni ematici raccolti dal cordone ombelicale in 102 pazienti, divise in tre gruppi a seconda del numero di parti (primipare; 2-4 parti; >5 parti), sono stati determinati TAC (*Total Antioxidant Capacity*), TOS (*Total Oxidant Status*) e OSI (*Oxidative Stress Index*). TAC ed indicatori di stress ossidativo sono risultati rispettivamente più alti e più bassi nei neonati di madri oltre il quarto parto rispetto agli altri due gruppi, con valori intermedi per i neonati delle primipare, in cui sono stati osservati valori più elevati di TAC e più bassi di TOS e OSI rispetto a quelli delle madri del secondo gruppo (2-4 parti). Gli autori hanno dedotto dai dati ottenuti l'esistenza di una correlazione tra numero di gravidanze ed aumento di stress ossidativo, unitamente ad un calo delle difese antiossidanti, oltre all'evidenza di un meccanismo compensatorio nei neonati di madri che avevano partorito più di 4 volte.

§ 2.2 Stress ossidativo in gravidanza ed al parto in medicina veterinaria

Le cellule presenti nel tessuto endometriale producono ROS nel corso dei normali processi metabolici, quindi gli embrioni sono vulnerabili al potenziale danno

ossidativo indotto dai ROS. Un aumento nella produzione di ROS può esitare in un arresto dello sviluppo embrionale, ma in condizioni fisiologiche il sistema antiossidante enzimatico costituito da SOD, CAT, GPx, assieme a meccanismi non enzimatici (GSH, glutathione) e vitamine (ad esempio vitamina E e β -carotene), interviene a protezione di cellula uovo ed embrione (Rizzo *et al.*, 2012).

Durante la gravidanza lo sviluppo embrionale e fetale è strettamente associato con un innalzamento dei livelli metabolici materni e placentari, che inevitabilmente espone la madre a danni di tipo ossidativo (Myatt, 2010), evidenziabili mediante il riscontro di valori aumentati di ROS e lipoperossidi. Inoltre, la placenta stessa è particolarmente esposta a stress ossidativo, dal momento che agisce da tramite fra il sangue materno, più ossigenato, e quello fetale. Questo comporta un innalzamento della produzione di radicali liberi altamente reattivi come l'anione superossido, che si traduce in una maggiore probabilità di insorgenza di stress ossidativo (Garrel *et al.*, 2010). La placenta produce anche altri ROS come monossido di azoto (NO), monossido di carbonio (CO) e perossinitrito (HNOO^\cdot) che esercitano un'azione importante sulla proliferazione e differenziazione dei trofoblasti, oltre che sullo sviluppo vascolare. Inoltre i ROS sono implicati nella trasduzione di segnale, sia nella placenta che nell'embrione, e favoriscono l'impianto dell'embrione regolando l'apoptosi (Abrahams *et al.*, 2004).

Alcuni studi (Frank e Groseclose, 1984; Lee *et al.*, 2011) hanno studiato l'evoluzione del sistema antiossidante enzimatico nei polmoni di coniglio nelle ultime fasi di gravidanza. Gli autori hanno riportato l'evidenza di un aumento considerevole (150%) di SOD, CAT e GPx che sono tra i maggiori antiossidanti enzimatici.

Lo stress ossidativo, che si instaura quando la produzione di ROS supera il potenziale antiossidante sistemico, gioca un ruolo importante in insorgenza e mantenimento di varie condizioni patologiche nel neonato (Mutinati *et al.*, 2014).

È stato dimostrato un rischio più elevato di stress ossidativo alla nascita in vitelli con livelli superiori di agenti pro-ossidanti rispetto alle madri (Gaal *et al.*, 2006; Albera e Kakofer, 2011).

Lo stress ossidativo entra in gioco anche in tutte le patologie correlate a distocia. I

vitelli nati da parto distocico che sono andati incontro ad ipossia prolungata secondaria ad allungamento patologico della fase espulsiva possono andare incontro ad problemi polmonari legati all'ipofunzionalità del centro del respiro (Schuijt, 1990).

La bradipnea causa una riduzione della ventilazione polmonare con ipossigenazione ematica e ipercapnia. Quando i sistemi tampone sono esauriti, si instaura acidosi metabolica aggravata anche dal metabolismo anaerobio che si attiva secondariamente alla carenza di ossigeno tissutale. L'acidosi si riflette negativamente su diverse funzioni metaboliche, quali ad esempio la termoregolazione (Carstens, 1994).

Albera e Kankofer (2011) hanno confrontato il profilo ossidativo/antiossidante di 25 bovine e dei loro vitelli, a partire da campioni ematici e colostrali prelevati al momento del parto, poi a 24h, 48h, 6 giorni e 12 giorni *post partum*. Sono stati determinati la concentrazione di TAC e GPx come indici di attività antiossidante, oltre a marker di perossidazione lipidica (LPI, Lipid Peroxidation Intensity) ed ossidazione proteica (SH, gruppi tiolici). Tutti i parametri tranne la GPx sono risultati notevolmente più elevati nel sangue dei neonati rispetto alle madri. TAC e GPx nel colostro sono risultati inferiori rispetto al sangue delle bovine e dei loro vitelli durante le prime 24 h *post partum*, mentre è stata registrata un'inversione del rapporto a partire dalle 24h. I valori di LPI sono risultati più alti nel colostro rispetto al plasma di madri e neonati durante le prime 48h. TAC e GPx hanno evidenziato un aumento dell'attività antiossidante durante il periodo di studio, in contrapposizione con un calo progressivo di SH ed una fluttuazione di LPI. Le dinamiche delle variazioni dei diversi parametri sono state interpretate come un temporaneo squilibrio nello stato ossidativo/antiossidante, seguito da risposta appropriata dall'organismo.

Mutinati e collaboratori (dati personali) hanno studiato la concentrazione sierica di ROS in puledri a 24 h dalla nascita. I risultati ottenuti dagli autori mostrano in media un valore di circa 330 U.CARR/l.

Po e collaboratori (2012) hanno valutato i metaboliti reattivi dell'ossigeno (d-ROMs) ed il potenziale biologico antiossidante (BAP) nel sangue, assieme ad altri parametri di attività ossidative ed antiossidanti e la concentrazione di perossido di idrogeno

H₂O₂ nell'esperto condensato in puledri sani e malati. Gli autori hanno riportato valori di BAP generalmente più alti in puledri normali rispetto ai malati, mentre nei puledri patologici sono risultati, come atteso, valori più bassi di attività antiossidanti, e più elevati per alcuni indicatori di stress ossidativo.

Per quanto riguarda la specie ovina, Rizzo e collaboratori (2008) hanno condotto uno studio in pecore gravide a termine, riportando un significativo innalzamento di ROS nel siero tra le 36 h precedenti e le 24 h successive al parto. Questo è stato il primo studio a valutare i livelli sierici di ROS nella pecora in prossimità del parto, interpretando l'incremento della produzione di metaboliti tossici come causa e conseguenza del processo infiammatorio acuto che si associa al parto.

Molti studi sono stati effettuati negli agnelli neonati per valutare i danni anatomici e funzionali derivanti dall'ipossia, e per mettere a punto strategie atte a limitare tali danni. Gli agnelli ipossici vanno incontro ad importanti alterazioni metaboliche quali ipercapnia e ipossia, iperlattatemia e acidosi metabolica. In uno studio del recente (Rey-Santano *et al.*, 2011) effettuato su agnelli pretermine ipossici e sani, sono stati dosati SOD, CAT e GPx su omogeneati di tessuto cerebrale. Gli antiossidanti enzimatici sono risultati più elevati nei soggetti asfittici rispetto al gruppo di controllo, dimostrando un aumento dell'attività difensiva secondaria all'insulto ipossico.

Nel suino sono stati condotti studi per testare l'efficacia di innovativi trattamenti finalizzati a contenere i danni provocati dallo stress ossidativo nei neonati. In uno studio di Liu e collaboratori del 2012 eseguito su lattinzoli con asfissia, è stata dimostrata l'efficacia della somministrazione di sodio bicarbonato nel ridurre la produzione di perossido di idrogeno a livello della corticale cerebrale, mentre tutti gli altri parametri (GSH ridotto, CAT, SOD) sono rimasti inalterati.

Capitolo 3

SCOPO DELLA TESI

Il presente studio si prefigge di indagare l'equilibrio ossidativo/antiossidativo in condizioni fisiologiche al momento del parto nell'asino. Se le pubblicazioni riguardanti la specie asinina, che sta crescendo di interesse negli ultimi tempi, sono scarse e vertono per lo più sul latte d'asina, mancano in letteratura informazioni relative all'equilibrio ossidativo/antiossidativo nel sistema fattrice-placenta-puledro, aspetto ampiamente indagato invece in umana da diversi autori, ed in altre specie animali. Le potenzialità della terapia antiossidante, su cui sono stati condotti numerosi studi, e la correlazione tra stress ossidativo e patologie perinatali, in particolare nel neonato prematuro, hanno portato ad avvertire la necessità di stabilire dei valori di riferimento in soggetti sani, premessa indispensabile per ulteriori indagini in animali patologici.

Per accertare lo stato del sistema ossidativo ed antiossidativo sono stati adottati rispettivamente d-ROMs Test e BAP Test, entrambi di rapida e semplice esecuzione. Gli esami sono stati eseguiti sul plasma ottenuto da campioni ematici prelevati al momento del parto da fattrice, cordone ombelicale ancora integro e puledro. Ci si attendono valori simili ma a quelli ottenuti nella cavalla in precedenti studi, e che venga supportata l'ipotesi di un ruolo protettivo svolto dalla placenta nei confronti del puledro.

Capitolo 4

MATERIALI e METODI

§ 4.1 Soggetti

Il presente studio è stato condotto durante le stagioni dei parti 2012 e 2013 su 16 asine di razza Sorcino Crociato dell'Amiata di età compresa tra 3 e 16 anni, 10 primipare e 6 pluripare, e sui relativi puledri, per un totale di 32 animali. Le asine erano alloggiate in paddock collettivi presso due strutture: a) Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa (S. Piero a Grado, PI); b) Fattoria Didattica delle Bandite di Scarlino (Puntone di Scarlino, GR), e venivano alimentate con fieno polifita *ad libitum* e mangime commerciale a base di fioccato in quantità calcolata secondo le raccomandazioni dell'NRC. In prossimità del parto le fattrici venivano ricoverate in box appositi e tenute sotto osservazione fino al verificarsi dello stesso.

§ 4.1.1 Criteri di inclusione

Criteri di inclusione per le fattrici: (1) durata della gravidanza $\geq 353 \pm 13$ giorni (Crisci et al., 2013); (2) parto eutocico non assistito; (3) profilassi antielmintica e regolari vaccinazioni per influenza equina, tetano ed EHV-1 secondo le linee guida della AAEP (http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm).

Criteri di inclusione per i puledri: (1) APGAR a 4 parametri effettuato a 5 minuti dalla nascita ≥ 7 (Vaala, 1994) come riportato in Tabella 1; (2) IgG ≥ 800 mg/dl a 24h di vita (Snap Foal® IgG test Kit, Idexx, USA); (3) tempi semeiologici nella norma, ovvero: riflesso di alzare la testa immediato, comparsa del riflesso di suzione entro 10 minuti dalla nascita, raggiungimento del decubito sternale entro 5 minuti, acquisizione della posizione quadrupedale in $127,5 \pm 70$ minuti, prima assunzione del colostro in 200 ± 67 minuti (Sgorbini et al., 2009). Ogni puledro è stato sottoposto ad esame obiettivo generale prima del prelievo ematico ed è risultato clinicamente sano.

	FC	FR	Tono muscolare	Stimolazione naso-orecchio
0	assente	assente	Estremità flaccide Decubito latero-laterale	Nessuna risposta
1	<60 bpm	Lenta, irregolare	Flessione degli arti Decubito latero-laterale	Reazione debole
2	>60 bpm	>60 apm	Posizione sternale	Reazione vigorosa

Tabella 1 - Indice di APGAR a 4 parametri (Martens, 1982).

Legenda – Ad ogni parametro viene assegnato un punteggio da 0 a 2; la somma dei punteggi riportati per ogni parametro dà il punteggio APGAR.

0-3: prognosi infausta; 4-6 depressione moderata, necessario un intervento terapeutico, prognosi riservata; ≥ 7 puledro nella norma.

§ 4.2 Monitoraggio e gestione del parto

Per ottenere indicazioni predittive sul momento del parto è stato effettuato, a partire dall'undicesimo mese di gestazione, un monitoraggio quotidiano della mammella di tutte le asine, tramite ispezione visiva e palpazione. In seguito alla valutazione, veniva attribuito un punteggio sulla base di sviluppo del parenchima, stato di replezione della ghiandola, forma e consistenza del capezzolo:

- 1 punto corrisponde a parenchima mammario di volume ridotto e scarsa consistenza, con capezzolo appiattito latero-lateralmente in quanto vuoto;
- 2 punti indicano una mammella mediamente turgida con capezzolo a forma conica, contenente secreto sieroso;
- 3 punti equivalgono a parenchima ghiandolare compatto e ben disteso, con capezzolo turgido contenente secreto da trasparente a leggermente paglierino, fino a lattescente.

Nelle asine che riportavano un punteggio pari a 3, è stata effettuata ogni giorno fino al parto un'analisi del secreto mammario con Foal WatchTM Test Kit for Daytime

Foaling Management (CHEmetrics, Inc., Calverton, VA – USA). Questo è un test colorimetrico quantitativo che misura la concentrazione del calcio nel secreto mammario, in quanto è stata dimostrata una correlazione positiva tra il suo innalzamento ed il verificarsi del parto. In particolare, valori di $\text{Ca} \geq 200$ ppm è stato associato all'espletamento del parto entro 24-48h nella maggior parte delle cavalle (Ley *et al.*, 1994). Nell'asina è stato riscontrato un andamento analogo alla cavalla nella composizione elettrolitica del secreto mammario per quanto riguarda sodio, calcio e potassio (Carluccio *et al.*, 2008).

Il prelievo del secreto veniva effettuato mediante leggera mungitura, quindi il campione ottenuto era sottoposto a valutazione macroscopica prima di procedere con l'esame biochimico. Per eseguire il test occorre miscelare 9 ml di acqua distillata con 1,5 ml di secreto, aggiungere 1 goccia di indicatore, poi agitare nuovamente la soluzione, quindi aspirarne una modica quantità in una siringa ed iniettarla lentamente nella fiala graduata contenente il rivelatore, fino ad ottenere il viraggio di colore da rosa-arancio a blu. Il valore numerico a livello del menisco indica la concentrazione di Ca in ppm.

Quando l'aspetto della mammella e del secreto mammario, ed il valore del Foal Watch® (200 ppm) (secondo indicazioni ditta produttrice) portavano a supporre l'approssimarsi del parto, l'asina veniva trasferita in appositi box-parto, e monitorata costantemente nell'arco delle 24 h. In fase prodromica sono state osservate in molti soggetti alterazioni comportamentali più o meno evidenti, quali irrequietezza e disappetenza, episodi di prolungata immobilità alternata a deambulazione in circolo, aumento della frequenza della minzione. Inoltre, nelle ore precedenti il parto, tutte le fattrici mostravano un atteggiamento particolare della coda che veniva tenuta immobile, portata sollevata e scostata dal perineo.

La fase espulsiva veniva osservata senza interferire con il suo normale svolgimento, se non al termine per agevolare la completa fuoriuscita del puledro e controllarne lo stato di salute onde intervenire tempestivamente, se necessario. Immediatamente dopo venivano effettuati i prelievi ematici, inoltre si registravano i dati relativi allo svolgimento del parto ed alla valutazione del puledro, annotandoli su apposita cartella. Infine, al secondamento, si effettuava la valutazione della placenta, secondo

quanto indicato in letteratura (Schlafel, 2011).

§ 4.3 Raccolta e preparazione dei campioni

Al termine del parto, subito dopo aver accertato lo stato di salute del neonato, sono stati effettuati simultaneamente due prelievi di sangue venoso, uno dalla vena giugulare della madre ancora a terra in ragione di 3 ml e l'altro dalla vena giugulare del neonato in ragione di 2,5 ml, ed un prelievo di 2,5 ml di sangue arterioso da una delle due arterie che decorrono nel cordone ombelicale, quando ancora tale struttura era intatta ovvero prima che si strappasse.

Il sangue è stato immediatamente trasferito in provette contenenti litio-eparina (FL Medical, Padova, Italia) e centrifugato a 3000 giri per 10 minuti. Il plasma ottenuto è stato prelevato con una pipetta monouso e trasferito in provette eppendorf. Queste sono state catalogate in base a: (1) data del parto; (2) nome della fattrice; (3) dicitura: “cordone”, “puledro” o “fattrice”, e poste in congelatore a -20°C. I campioni di plasma sono stati conservati a -18°C fino al momento della processazione.

§ 4.4 Analisi biochimiche

In ogni campione di plasma è stato determinato il valore plasmatico del lattato (Accutrend Lactate®, Micralab srl, MI), la concentrazione plasmatica dei radicali idrossilici tramite d-ROMs (*Reactive Oxygen Metabolites-derivates*) Test (Diacron International srl, Grosseto) e lo stato del potenziale biologico antiossidante (BAP) tramite BAP Test (Diacron International srl, Grosseto). I test per d-ROMs e BAP sono stati effettuati impiegando uno spettrofotometro (Slim, SEAC, Firenze). L'attendibilità dei valori ottenuti su campioni sottoposti a conservazione era stata verificata nella specie equina per entrambi i test da studi precedenti (Celi, 2010).

d-ROMs Test

Consiste nella determinazione colorimetrica dei metaboliti reattivi dell'ossigeno. I d-ROMs presenti nel plasma (principalmente gli idroperossidi), a contatto con il ferro

che viene liberato dalle proteine plasmatiche in presenza di un tampone acido (Reagente R1), generano radicali alcossilici e perossilici secondo la reazione di Fenton. Questi a loro volta reagiscono con un'ammina aromatica sostituita contenuta in una miscela cromogena (Reagente R2), ossidandola e determinando quindi un viraggio del campione al rosa. L'intensità del colore viene valutata con uno spettrofotometro, in modo da avere la misura della concentrazione degli idroperossidi nel plasma in esame, in accordo alla legge di Lambert-Beer.

Dopo aver effettuato la calibrazione, sono stati dispensati in una provetta 1 ml di tampone (Reagente R1), quindi 10 µl di reagente (Reagente R2), ed infine 10 µl di plasma. La soluzione è stata mescolata delicatamente ed introdotta nello spettrofotometro. Dopo circa 60" è stato possibile leggere i risultati del test, espressi in Unità Carratelli (U.CARR).

Tale procedura è stata ripetuta per ogni campione raccolto al momento del parto in fattrice, cordone ombelicale e puledro.

BAP Test

Consiste nella determinazione colorimetrica del potenziale biologico antiossidante. Si basa sulla riduzione degli ioni ferrici Fe^{3+} a ioni ferrosi Fe^{2+} operata dal complesso di molecole antiossidanti endogene ed esogene presenti nel plasma. Il campione in esame viene disciolto in una soluzione colorata ottenuta aggiungendo una fonte di ioni ferrici (Reagente R2) ad un cromogeno (Reagente R1). Quando gli ioni ferrici, complessati al cromogeno, vengono ridotti dal plasma, la soluzione si decolora proporzionalmente all'entità della riduzione operata in un intervallo di 5 minuti.

Dopo aver effettuato la calibrazione, sono stati dispensati in una provetta 1 ml di miscela cromogena (Reagente R1) e 50 µl di soluzione di cloruro ferrico (Reagente R2), quindi sono stati aggiunti 10 µl di plasma. La soluzione è stata mescolata delicatamente ed introdotta nello spettrofotometro. Dopo 5 minuti di incubazione è stato possibile leggere i risultati del test, espressi in µmol/L.

La procedura è stata ripetuta per ogni campione raccolto al momento del parto in fattrice, cordone ombelicale e puledro.

§ 4.5 Analisi statistiche

I dati ottenuti dalle analisi biochimiche, espressi come media \pm deviazione standard ($M \pm DS$), sono stati analizzati con il test di Komolgorov-Smirnov per verificarne la distribuzione. Poiché essi non presentavano una distribuzione gaussiana, sono stati applicati il test di Mann-Whitney ed il Dunn test come *post-hoc* per appurare eventuali differenze tra fattrice, cordone e puledro, sia per i d-ROMs che per il BAP. È stato inoltre effettuato il test di Spearman per verificare la correlazione tra lattato e d-ROMs, e tra d-ROMs e BAP, sia per le fattrici che per i puledri. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0.05$.

Capitolo 5

RISULTATI

A seguito delle analisi biochimiche e statistiche svolte su campioni ematici prelevati al momento del parto da cordone ombelicale, puledro e fattrice asinina, sono stati ottenuti i valori riportati in Tabella 2.

Le analisi statistiche hanno individuato differenze significative ($p < 0,01$) per i d-ROMs tra fattrice e puledro, e tra fattrice e cordone. Esiste inoltre una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi (puledro vs cordone vs fattrice) per quanto riguarda la concentrazione dei BAP ($p < 0,01$).

Infine è stata evidenziata una correlazione positiva tra la concentrazione di lattato ($5,5 \pm 0,8$ mmol/L) ed i d-ROMs nel puledro ($r = 0,617$; $p < 0,01$), mentre non è stata evidenziata una correlazione statistica tra lattato ($3,5 \pm 0,6$ mmol/L) e d-ROMs nella fattrice.

Non è stata evidenziata correlazione tra d-ROMs e BAP sia per fattrice che per puledro.

	Fattrice asinina	Cordone ombelicale	Puledro
d-ROMs U.CARR	$257 \pm 41,2^a$	$160,3 \pm 27,2^b$	$198 \pm 67,8^b$
BAP $\mu\text{mol/L}$	$2525,3 \pm 632,3^a$	$2414,2 \pm 624,7^b$	$2340,1 \pm 494,2^c$

Tabella 2 – Valori di d-ROMs e BAP in fattrice, cordone e puledro alla nascita, espressi in media \pm deviazione standard.

Legenda - d-ROMs: Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno; BAP: Potenziale Antiossidante Biologico. Per le lettere superscritte in riga $a \neq b \neq c$.

Capitolo 6

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Lo stress ossidativo si instaura quando l'equilibrio normalmente presente tra agenti ossidanti ed antiossidanti subisce alterazioni in conseguenza dell'innalzamento dei primi e/o della carenza relativa o assoluta dei secondi. Quando le difese antiossidanti si rivelano inadeguate a mantenere la fisiologica omeostasi ossidativa, per cui il rapporto tra ROS e *scavengers* tende a sbilanciarsi a favore dei primi, possono insorgere danni ossidativi più o meno estesi. Questo si può verificare in conseguenza di stati patologici, infatti ad oggi è stata dimostrata una correlazione con lo stress ossidativo per numerose patologie (Soffler, 2007), ma anche in diverse condizioni “parafisiologiche”. Esercizio, gravidanza e parto comportano uno stress importante per l'organismo ed un significativo aumento delle esigenze metaboliche, soprattutto energetiche, che esita in un incremento della produzione di ROS.

Se attualmente la relazione tra stress ossidativo è ampiamente indagata nel cavallo sportivo (Kirshvink, 2008), il ruolo dello stress ossidativo in gravidanza e al momento del parto è ancora poco documentato in medicina equina, e mancano completamente valori di riferimento per quanto riguarda l'asino.

Questo studio indaga il profilo ossidativo/antiossidante di un gruppo di asine e relativi puledri tramite la misurazione della concentrazione di d-ROMs e BAP in campioni ematici prelevati al momento del parto.

Il livello dei d-ROMs nel presente lavoro è risultato maggiore nel sangue delle asine rispetto che in quello di cordone ombelicale e puledro alla nascita. È stata infatti riscontrata una differenza statisticamente significativa nella specie asinina per i d-ROMs in fattrice vs puledro ($257 \pm 41,2$ U.CARR vs $198 \pm 67,8$ U.CARR) ed in fattrice vs cordone ($257 \pm 41,2$ U.CARR vs $160,3 \pm 27,2$ U.CARR). Questa differenza potrebbe essere imputabile ad un superiore livello metabolico nella fattrice rispetto al puledro, in conseguenza di gravidanza e parto. Inoltre sulla scorta di questi dati può essere avanzata l'ipotesi, proposta in umana, che la placenta rivesta un ruolo protettivo nei confronti del feto contro lo stress ossidativo in gravidanza ed al parto

(Qanungo *et al.*, 2004). Secondo gli autori, il fatto che la concentrazione di agenti ossidanti sia più elevata nella parte materna della placenta rispetto a quella fetale potrebbe essere attribuito ad una funzione di filtro svolta dall'organo attraverso un meccanismo di aumentata secrezione di ROS da parte della placenta a livello del versante materno rispetto a quello fetale (Walsh *et al.*, 1993; 1994).

Nella cavalla la concentrazione ematica di d-ROMs in fattrice, puledro e cordone al momento del parto è superiore nella madre, rispetto a cordone e puledro (Sgorbini *et al.*, dati personali). Confrontando i valori da noi ottenuti nell'asino e quelli rinvenuti per il cavallo, è stato possibile notare una analogia nell'andamento dei dati nelle due specie. Difatti anche nella cavalla è stata riportata una differenza statisticamente significativa dei d-ROMs in fattrice vs puledro e fattrice vs cordone. I risultati della nostra indagine, relativi alle differenze nella concentrazione ematica di d-ROMs tra asina e cordone ombelicale/puledro al parto, sono in linea con precedenti studi condotti nella cavalla (Sgorbini *et al.*, dati personali) ed in umana (Rogers *et al.*, 1999; Lista *et al.*, 2010). In umana, infatti, si osserva un aumento progressivo di marker ossidativi con il procedere della gravidanza, fino ad un picco in corrispondenza del parto (Lista *et al.*, 2010). Inoltre, la concentrazione di agenti ossidanti è più elevata nel sangue materno che in quello del cordone al momento del parto (Rogers *et al.*, 1999).

Confrontando i valori di d-ROMs ottenuti nel presente studio nella specie asinina con quelli rilevati nella specie equina, l'asino mostra concentrazioni più elevate sia per quanto riguarda la fattrice ($257 \pm 41,2$ U.CARR nell'asino vs $127,4 \pm 45,5$ U.CARR nel cavallo) che il cordone ($160,3 \pm 27,2$ U.CARR vs $143,3 \pm 61,0$ U.CARR) e puledro ($198 \pm 67,8$ U.CARR vs $188,5 \pm 62,4$).

Nel presente studio, anche la concentrazione del BAP (Potenziale Antiossidante Biologico) è risultata più elevata nella fattrice che in cordone e puledro. In particolare, sono emerse differenze statisticamente significative per il BAP di fattrice vs puledro ($2525,3 \pm 632,3$ $\mu\text{mol/L}$ vs $2340,1 \pm 494,2$ $\mu\text{mol/L}$), fattrice vs cordone ($2525,3 \pm 632,3$ $\mu\text{mol/L}$ vs $2414,2 \pm 624,7$ $\mu\text{mol/L}$), e puledro vs cordone ($2340,1 \pm 494,2$ $\mu\text{mol/L}$ vs $2414,2 \pm 624,7$ $\mu\text{mol/L}$). Il riscontro di una capacità antiossidante superiore nell'organismo materno può essere giustificato con la

transitoria insufficienza del sistema antiossidante del puledro asinino alla nascita, come già ipotizzato in medicina umana e veterinaria nel bovino (Inanami *et al.*, 1999; Lista *et al.*, 2010). L'inefficienza del sistema antiossidante neonatale, infatti, viene attribuita principalmente a due cause, quali la scarsa riserva di antiossidanti endogeni e l'incapacità di operare una *up regulation* dei meccanismi di difesa in risposta all'aumento della produzione ROS (Inanami *et al.*, 1999; Lester, 2011). Queste sostanze aumentano nel neonato alla nascita in ragione del subitaneo incremento della disponibilità di ossigeno, in quanto durante il parto il neonato si trova a passare in un breve intervallo di tempo dall'ambiente uterino, tendenzialmente ipossico, all'esterno. L'aumento dell'ossigeno disponibile può tradursi, quindi, in una incrementata produzione di ROS che il sistema antiossidante neonatale ha difficoltà a contenere perché insufficiente (Saugstad *et al.*, 1996; Buonocore *et al.*, 2000; Lista *et al.*, 2010).

L'andamento del BAP nella specie asinina è sovrapponibile a quanto riscontrato nella specie equina (Sgorbini *et al.*, dati personali). Per il cavallo, infatti, è stata riscontrata un'attività antiossidante più elevata nella fattrice, intermedia nel cordone ed inferiore nel neonato. I nostri risultati sembrano confortare l'ipotesi di una ridotta attività antiossidante nel puledro asinino alla nascita presumibilmente imputabile ad una immaturità del sistema di difesa, come già dimostrato sia in medicina umana che in veterinaria nel puledro e nel vitello (Inanami *et al.*, 1999; Lista *et al.*, 2010). Anche per il BAP, così come per i d-ROMs, i valori ottenuti nel presente studio nella specie asinina sono superiori rispetto a quanto evidenziato nel cavallo.

Per quanto riguarda l'equilibrio ossidativo/antiossidante, il nostro studio non ha evidenziato correlazione tra BAP e d-ROMs nel puledro, come già osservato per il puledro equino (Sgorbini *et al.*, dati personali), né nella fattrice. Quest'ultimo dato, invece, differisce da quanto osservato nella cavalla dove è stata evidenziata una correlazione tra i due parametri. Questo risultato potrebbe essere legato alla paucità della popolazione asinina esaminata.

I nostri risultati hanno evidenziato una correlazione positiva ($r=0,617$; $p<0,01$) nel puledro tra lattatemia ($5,5\pm0,8$ mmol/L) e d-ROMs ($188,5\pm62,4$ U.CARR) al momento della nascita. Questo potrebbe essere dovuto ad un'azione del lattato sulla

produzione di agenti ossidanti. L'aumento del lattato ematico nella specie equina riconosce tra le cause più frequenti la riduzione della perfusione tissutale e del trasporto di ossigeno con conseguente conversione da un metabolismo energetico tendenzialmente aerobico a processi di tipo anaerobico (Corley *et al.*, 2005; Wotman *et al.*, 2009; Tennen-Brown *et al.*, 2012). Il lattato influenza in modo diretto lo stato ossidativo in quanto incrementa la produzione dei ROS a livello mitocondriale (Nalos *et al.*, 2013). Nel nostro studio i risultati supportano l'ipotesi di un incremento dei d-ROMs conseguente all'aumento della concentrazione di lattato, comunque entro i limiti fisiologici.

Infine, i segni comportamentali riscontrati in fase prodromica nelle asine incluse nel presente studio sono sovrapponibili a quanto riportato in bibliografia da altri (Christensen, 2011) ad eccezione di un atteggiamento particolare della coda che veniva tenuta immobile, portata sollevata e scostata dal perineo. A conoscenza degli autori, questo atteggiamento non è mai stato osservato negli equidi.

Le più comuni patologie perinatali che colpiscono il puledro sono associate con valori elevati dei maggiori indicatori di stress ossidativo, pertanto è auspicabile che la ricerca si orienti verso la valutazione dei biomarkers dello stress ossidativo in puledri neonati patologici al fine di fare diagnosi precoce ottimizzando così la gestione dei soggetti malati con adeguati e tempestivi interventi terapeutici. Un ulteriore sviluppo potrebbe consistere nell'individuazione di sostanze antiossidanti efficaci nel prevenire e/o trattare stati patologici correlati allo stress ossidativo.

BIBLIOGRAFIA

Abiaka C, Machado L (2012). Nitric oxide and antioxidant enzymes in venous and cord blood of late preterm and term Omani mothers. *Sultan Qaboos University Med J*, 12 (3): 300-5.

Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G (2004). Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 51: 275–82.

Agarwal A, Gupta S, Sharma R (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3: 28.

Albera E, Kankofer M (2011). The comparison of antioxidative/oxidative profile in blood, colostrum and milk of early post-partum cows and their newborns. *Reprod Domest Anim*, 46: 763–9.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593–615.

Al-Saleh I, Al-Rouqi R, Obsum CA, Shinwari N, Mashhour A, Billedo G, Al-Sarraj Y, Rabbah A (2014). Mercury (Hg) and oxidative stress status in healthy mothers and its effect on birth anthropometric measures. *International Journal of Hygiene and Enviromental Health*, 217: 567-85.

Argüelles S, Machado MJ, Ayala A, Machado A, Hervías B (2006). Correlation between circulating biomarkers of oxidative stress of maternal and umbilical cord blood at birth. *Free Radic Res*, 40(6): 565-70.

Available at: http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed Feb 10, 2012

Bansal RK, Goldsmith PC, He Y, Zaloudek CJ, Ecker JL, Riemer RK (1997). A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. *J Clin Invest*, 99(10): 2502-8.

Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R (2000). Total Hydorperoxide and

advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Ped Res*, 47(2): 221-4.

Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P, Bracci R (2002). Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Ped Res*, 88(8): 707-10.

Carluccio A, De Amicis I, Panzani S, Tosi U, Faustini M, Veronesi MC (2008). Electrolytes changes in mammary secretions before foaling in jennies. *Reprod Domest Anim*, 43: 162–5.

Carstens GE (1994). Cold thermoregulation in the newborn calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 10: 69–106.

Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Alonso ML, Pereira V, Benedino JL (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J*, 169: 286-92.

Castillo C, Hernandez J, Pereira V, Sotillo J, Alonso ML, Benedino JL (2006). Plasma malondialdehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res Vet Sci*, 80: 133-9.

Celi P, Sullivan M, Evans D. (2010). The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *Vet J*, 183: 217-8.

Christensen BW. Parturition. In McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE Varner DD (eds). *Equine Reproduction*. 2nd ed., New York: Blackwell Publishing Ltd, USA, pp. 2268-76.

Corley KTT, Donaldson LL, Furr MO (2005). Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals. *Equine vet J*, 37(1): 53-9.

Creasy R (1994). Preterm labor and delivery. In Creasy R, Resnik R (eds): *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*. W.B. Saunders ed, Philadelphia, USA, pp 494–5.

Crisci A, Rota A, Panzani D, Sgorbini M, Ousey JC, Camillo F (2014). Clinical, ultrasonographic, and endocrinological studies on donkey pregnancy. *Theriogenol*, 81(2): 275-83.

Davis JM, Auten RL (2010). Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15(4): 191-5.

Fainaru O, Almong B, Pinchuck I, Kupferminc MJ, Lichtenberg D, Many A (2002). Active Labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. *BJOG*, 109: 938-41

Farrow KN, Groh BS, Schumacker PT, Lakshminrusimha S, Czech L, Gugino SF, Russell JA, Steinhorn RH (2008). Hyperoxia increases phosphodiesterase-5 expression and activity in ovine fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*, 102: 226–33.

Frank L, Groseclose EE (1984). Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr Res*, 18(3): 240–4.

Gaál T, Ribiczeyné-Szabó P, Stadler K, Jakus J, Reiczigel J, Kövér P, Mézes M, Sümeghy L (2006). Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 143: 391–6.

Garrel C, Fowler PA, Al-Gubory KH (2010). Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J Endocrinol*, 205: 107-16.

Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A, Kovaks L, Laslo A (2002). Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 103: 136-9.

Halliwell B, Gutteridge JM (1989). Protection against oxidants in biological systems. In Halliwell, Gutteridge (eds): *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed, Clarendon Press, Oxford, UK, pp. 92–8.

Inanami O, Shiga A, Okada K, Sato R, Miyake YL, Kuwabara M (1999). Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves. *Am J Vet Res*, 60: 452-7.

Lee JW, Davis JM (2011). Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr*, 23(2): 161-6.

Ley WB (1994). Management of the foaling mare: prediction readiness for birth and inducing foaling. *Vet Med*, 89: 570–7.

Lester GD (2011). Prematurity, Dismaturity and assessment of maturity. Part I. The Foal: problems of the Immediate Postpartum Period. In McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE Varner DD (eds). *Equine Reproduction*. 2nd ed., New York: Blackwell Publishing Ltd, pp. 121-7.

Lista G, Castoldi F, Compagnoni G, Maggioni C, Cornelissen G, Halberg F (2010). Neonatal and maternal concentrations of hydroxyl radical and total antioxidant system: protective role of placenta against fetal oxidative stress. *Neuroendocrin Lett*, 31(3): 319-24

Liu JQ, Manouchehri N, Lee TF, Yao M, Bigam DL, Cheung PY (2012). Infusing sodium bicarbonate suppresses hydrogen peroxide accumulation and superoxide dismutase activity in hypoxic-reoxygenated newborn piglets. *PloS One*, 7(6): e39081.

Llanos MN, Ronco AM (2009). Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reprod Toxicol*, 27: 88-92

Martens RJ (1982). Pediatrics. In Mansmann RA, McAllister ES, Pratt PW (eds): *Equine Medicine and Surgery*. Santa Barbara: American Veterinary Publications, USA.

Myatt L (2010). Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, 31(S): 66-9.

Mutinati M, Pantaleo M, Roncetti M, Piccinno M, Rizzo A, Sciorsci RL (2014). Oxidative Stress in Neonatology. *Reprod Dom Anim*, 49: 7–16.

Mocatta TJ, Winterbourn CC, Inder TE, Darlow BA (2004). The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. *Free Radic Res*, 38: 185-91.

Mutlu B, Aksoy N, Cakir N, Celik H, Erel O (2011). The effects of the mode of delivery on oxidative-antioxidative balance. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 24(11): 1367-70.

Mutlu B, Bas AY, Aksoy N, Taskin A (2012). The effect of maternal number of births on oxidative and antioxidative systems in cord blood. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 25(6): 802-5.

Nalos M, McLean AS, Huang S (2013). Revisiting lactate in critical illness. In Vincent JL (ed). *Annual Update in Intensive Care and Emergency*, Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, pp. 413-23.

Negi R, Pande D, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD (2012). Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight in neonates. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(8): 1338-41.

Noh EJ, Kim YH, Cho MK, Kim JW, Kim JW, Byun YJ, Song TB (2014). Comparison of oxidative stress markers in umbilical cord blood after vaginal and cesarean delivery. *Obstet Gynecol Sci*, 57(2): 109-114

Osorio JC, Cruz E, Milanés M, Ramírez Y, Sierra M, Cruz M, Sanfiel L (2011). Influence of maternal redox status on birth weight. *Reprod Toxicol*, 31: 35-40

Perrone S, Tataranno ML, Negro S, Longini M, Marzocchi B, Proietti F, Iaconi F, Capitani S, Buonocore G (2010). Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early Hum Dev*, 86(4): 241-4.

Qanungo S, Aparna A, Mukherjee M (1999). Antioxidant status and lipid peroxidation in human feto-placental unit. *Clin Chem Acta*, 285(1-2): 1-12.

Qanungo S, Mukherjee M (2000). Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem*, 215(1-2): 11-9.

Po E, Williams C, Muscatello G, Celi P (2013). Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of Thoroughbred foals. *Vet J*, 192(2) 269-71.

Ricci Z, Ronco C (2013). Neonatal RIFLE. *Nephrol Dial Transplant*, 28(9): 221-4.

Rey-Santano C, Mielgo VE, Gastiasoro E, Murgia X, Lafuente H, Ruiz-del-Yerro E, Valls-i-Soler A, Hilario E, Alvarez FJ (2011). Early cerebral hemodynamic, metabolic, and histological changes in hypoxic ischemic fetal lambs during postnatal life. *Front Neurosci*, 5: 111.

Rizzo A, Mutinati M, Spedicato M, Minoia G, Trisolini C, Jirillo F, Sciorsci RL (2008). First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the periparturient period in the ewes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 30: 741-6.

Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL (2012). Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Dom Anim*, 47: 334-52.

Rogers MS, Mongelli M, Tsang KH, Wang CC (1999). Fetal and maternal levels of lipid peroxides in term pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 78: 120-4.

Saker M, Mokhtari N, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M (2008). Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *European J Obst Gynecol and Reproduc Biol*, 141: 95-99.

Saugstad OD (1988). Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res*, 23: 143-50.

Saugstad OD (1996). Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr*, 85: 1-5.

Schlafer DH (2011). Examination of the placenta. In McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (eds). *Equine Reproduction*. 2nd ed., New York: Blackwell Publishing Ltd, USA, pp. 99-110.

Soffler C (2007). Oxidative stress. *Vet Clin Equine Pract*, 23: 135-57.

Tennent-Brown BS (2012). Interpreting lactate measurement in critically ill horses: diagnosis, treatment, and prognosis. *Comp Contin Educ Vet*, 34(1): 1-6.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1): 1-40.

Vajdovich P (2008). Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *Vet Clin Small Anim Pract*, 38: 31-123.

Viteri SE, Liu X, Martin A, Tolomei K (1995). True absorption and retention of supplemental iron is more efficient when administered every-three days rather than daily to iron-normal and iron-deficient rats. *J. Nutr*, 125: 82–91.

Walsh SW, Wang Y (1993). Secretion of lipid peroxides by human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 169(6): 1462-6.

Walsh SW, Wang Y, Jesse R (1995). Placental reproduction of lipid peroxides, thromboxane and prostacyclin in pre-eclampsia. *Hipertens Pregnancy*, 15: 101-11.

Wotman K, Wilkins PA, Palmer JE, Boston RC (2009). Association of blood lactate concentration and outcome in foals. *J Vet Intern Med*, 23(3): 598-605.